崔明辉, 张奇, 陈俊颖, 等. 基于转录后调控筛选蛹虫草靶向作用 *egfr* 的 miRNA[J]. 食品工业科技, 2026, 47(8): 427−436. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040012

CUI Minghui, ZHANG Qi, CHEN Junying, et al. Investigating the Post-transcriptional Regulation of *egfr* in Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells by *Cordyceps militaris* Based on miRNA[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(8): 427−436. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040012

·营养与保健·

基于转录后调控筛选蛹虫草靶向作用 *egfr* 的 miRNA

崔明辉[1], 张　奇[1], 陈俊颖[1], 王　多[1], 王升厚[2,3], 逄洪波[1], 王　泽[1,2,3,*]

（1.沈阳师范大学生命科学学院, 辽宁沈阳 110034;
2.辽宁省功能性蛹虫草重点实验室, 辽宁沈阳 110034;
3.沈阳市功能性蛹虫草产业技术研究院, 辽宁沈阳 110034）

摘　要: 目的：旨在获得蛹虫草抗肿瘤机制中转录后靶向调控 *egfr* 的 miRNA。方法：通过水浴浸提结合真空冷冻干燥技术制备蛹虫草水提物。4 mg/mL 蛹虫草处理 A549 细胞 24 h 后转录组测序，根据 KEGG 通路富集分析结果获得候选 miRNAs。瞬时转染 miRNA mimics 构建功能获得模型，MTT 法及 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 miRNAs 对细胞活力的影响。同时，采用瞬时转染 miRNA inhibitor 构建功能缺失模型，联用蛹虫草提取物处理，MTT 法检测蛹虫草-miRNA 轴对细胞活力的影响，qRT-PCR 和免疫细胞化学染色法分析该调控轴对 A549 细胞 EGFR 转录水平和蛋白水平的影响。结果：共获得 7211 个 DEGs，并在“MicroRNAs in cancer”信号通路显著富集（排序 3）。筛选到与肺腺癌预后相关的 miRNAs 共 11 个，其中 6 个与 *egfr* 存在靶向调控关系，且低表达水平的肺腺癌患者预后较差（P<0.05）。蛹虫草处理可诱导 *miR-125b-1-3p*、*miR-125b-5p* 和 *miR-145-5p* 表达水平显著上调（P<0.01），且种子序列与 *egfr* 3'UTR 区存在潜在结合位点。3 个 miRNAs 的促增殖活性具有肿瘤特异性，高表达状态可诱导 A549 细胞发生更高比例的早期凋亡。蛹虫草可通过促进 *miR-125b-1-3p*、*miR-125b-5p* 和 *miR-145-5p* 的表达（P<0.05），靶向下调 EGFR 蛋白的表达（P<0.05），抑制肺癌 A549 细胞的增殖。结论：蛹虫草具有靶向调控 miRNAs（*miR-125b-1-3p*、*miR-125b-5p* 和 *miR-145-5p*）-EGFR 轴的抗肿瘤活性，本研究为蛹虫草开发为辅助肿瘤治疗的功能性食品提供了理论支撑。

关键词: 蛹虫草, 表皮生长因子受体, 转录后调控, 微小核糖核酸, 非小细胞肺癌细胞
中图分类号: Q789　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)08−0427−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040012
本文网刊:

Investigating the Post-transcriptional Regulation of *egfr* in Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells by *Cordyceps militaris* Based on miRNA

CUI Minghui[1], ZHANG Qi[1], CHEN Junying[1], WANG Duo[1], WANG Shenghou[2,3], PANG Hongbo[1], WANG Ze[1,2,3,*]

（1.College of Life Science, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China;
2.Liaoning Key Laboratory of Functional *Cordyceps militaris*, Shenyang 110034, China;
3.Industrial Technology Research Academy for *Cordyceps militaris* with Functional Value of Shenyang, Shenyang 110034, China）

Abstract: Objective: To identify the miRNAs that post-transcriptionally target the regulation of *egfr* in the antitumor mechanism of *Cordyceps militaris*. Methods: An aqueous extract of *Cordyceps militaris* was prepared using water-bath extraction combined with vacuum freeze-drying. Transcriptome sequencing was performed on A549 cells after 24 h

收稿日期: 2025−04−03
基金项目: 辽宁省教育厅本科高校基本科研项目平台建设专项（LJ232510166004）; 辽宁省本科高校基本科研项目创新团队支持计划专项（LJ202410166052）。
作者简介: 崔明辉（2001−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 药用真菌资源研究与开发, E-mail: 2567617421@qq.com。
*** 通信作者:** 王泽（1979−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 药用真菌资源研究与开发, E-mail: 26186987@qq.com。

treatment with 4 mg/mL *Cordyceps militaris* extract. Candidate miRNAs were selected on the basis of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. Functional gain models were constructed by transient transfection of miRNA mimics, and the effects of miRNAs on cell viability were assessed using the MTT assay and Annexin V-FITC/PI double staining. Functional loss models were established by transient transfection of miRNA inhibitors, in combination with *Cordyceps militaris* extract treatment. The effect of Cordyceps-miRNA axis on cell viability was evaluated using the MTT assay, and its regulatory effects on EGFR transcription and protein levels in A549 cells were analyzed using qRT-PCR and immunocytochemical staining. Results: A total of 7211 DEGs were obtained and significantly enriched in the "MicroRNAs in cancer" signaling pathway (Sort 3). Eleven miRNAs were screened for their association with lung adenocarcinoma prognosis, *miR-125a-3p*, *miR-125a-5p*, *miR-125b-1-3p*, *miR-125b-2-3p*, *miR-125b-5p* and *miR-145-5p* were all associated with *egfr* in a target-regulatory manner, and patients with lung adenocarcinomas that showed low expression levels had a poorer prognosis (P<0.05). *Cordyceps militaris* treatment induced significant upregulation of *miR-125b-1-3p*, *miR-125b-5p* and *miR-145-5p* expression levels (P<0.01), and the seed sequences had potential binding sites with the *egfr* 3'-UTR region. *miR-125b-1-3p*, *miR-125b-5p*, and *miR-145-5p* exhibited tumor-specific pro-proliferative activities, and their high expression status induced a higher percentage of early apoptosis in A549 cells. *Cordyceps militaris* inhibited the proliferation of lung cancer A549 cells by promoting the expression of *miR-125b-1-3p*, *miR-125b-5p*, and *miR-145-5p* (P<0.05) and downregulating the expression of EGFR (P<0.05). Conclusion: *Cordyceps militaris* exerts anti-tumor activity by targeting and regulating the miRNAs (*miR-125b-1-3p*, *miR-125b-5p* and *miR-145-5p*)-EGFR axis, providing theoretical support for its development as a novel functional food for adjuvant tumor therapy.

Key words: *Cordyceps militaris*; epidermal growth factor receptor; post-transcriptional regulation; microRNA; non-small cell lung cancer cells

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是全球致死率最高的癌症之一,约占肺癌患者的 85%[1]。非小细胞肺癌因其细胞分裂慢、扩散转移较晚、症状不典型、缺乏早期诊断依据等恶性状,约 75% 的非小细胞肺癌患者被发现时已处于癌症中晚期,5 年生存率极低[2]。microRNA(miRNA)是进化上保守的一类小型调节性非编码 RNA,研究表明,miRNA 介导的转录后调控异常是肿瘤形成与发展的重要机制和标志[3],数百种 miRNAs 已被证实能够显著增强肿瘤治疗的敏感性,在临床应用中展现出作为新型治疗策略的巨大潜力[4−5]。*miR-125a-3p* 是非小细胞肺癌化疗的重要预后生物标志物,过表达 *miR-125b-1-3p* 可以抑制 NSCLC 细胞的增殖、迁移及侵袭,主要通过抑制 S1PR1 诱导凋亡的发生,在 NSCLC 中起到抑癌基因的作用[6]。*miR-125a-3p* 在癌旁组织中的表达水平高于 NSCLC 组织,化疗后 *miR-125a-3p* 的高表达水平可延长患者总体生存率和无病生存率[7−8]。*miR-133a-3p* 的过表达可抑制 NSCLC 细胞的增殖、侵袭和迁移,且通过负调节 ERBB2 的表达而起到抑癌作用,*miR-133a-3p*/ERBB2 轴已成为诊断和治疗 NSCLC 的新型药物靶点[9]。因此,基于 miRNA 介导的转录后调控开展抗肿瘤药物筛选,为癌症治疗提供了新的研究方向。

表皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)隶属于酪氨酸激酶受体 ErbB 家族。*egfr* 突变在肺腺癌中是最常见的基因突变之一,*egfr* 基因突变,如外显子 19 缺失、L858R 点突变会导致激酶域持续活化,约占东亚人群肺腺癌的 30%~40%[10]。*egfr* 信号通路的异常激活可诱导肺癌细胞增殖、转移和侵袭,参与肿瘤细胞免疫逃逸,在肺癌的发生和发展过程中起推动作用,与肺癌的恶性程度和预后不良密切相关。目前,临床针对 NSCLC 的靶向治疗中,EGFR 酪氨酸激酶抑制剂已发展至第三代,*egfr* 已成为抗肺癌药物研发的重要靶点[11−13]。蛹虫草作为新资源食品,富含具有多靶点调控特性的天然活性成分,已成为抗肿瘤药物研发的重要药用真菌资源。本实验室前期结果显示,蛹虫草可以抑制人肺癌细胞 A549、人胃癌细胞 BGC-823、人乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞增殖活性,并对凋亡、铁死亡等 RCD 信号通路具有调控作用[14]。已有研究显示,虫草素处理可抑制人肺腺癌 H1975 细胞 *egfr*、AKT 和 ERK1/2 的磷酸化水平,发挥抗肿瘤作用[15]。*egfr* 突变的细胞对虫草素处理具有高敏感性,且虫草素的体内、外抗癌效果甚至优于 NSCLC 临床治疗靶向药物吉非替尼[16]。但蛹虫草是否可以通过 *egfr* 的转录后调控影响 NSCLC 的发生发展,目前仍缺乏系统性的研究证据。因此,本研究整合转录组测序数据与生物信息学分析,结合分子生物学验证实验,首次从 miRNA-*egfr* 轴的视角探究蛹虫草的抗肿瘤机制,为其辅助肺癌靶向治疗的研发提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

人肺癌细胞株 A549 人肺正常上皮细胞 BEAS-2b 武汉博士德生物工程有限公司;F-12K 完全培养液 武汉美仑生物技术有限公司;胎牛血清 北京四季青生物工程材料有限公司;功能性蛹虫草品系(专利号:ZL201310728874.4) 辽宁省功能性蛹虫草重点实验室栽培提供;KEL™ RNA Transfection Reagent 美国 KEL Biotech 公司;miRNA mimics miRNA inhibitor 苏州吉玛基因股份有限公司;

FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2、Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit　南京诺唯赞生物科技股份有限公司；PrimeScript RT 试剂盒　日本 TaKaRa 公司；miRNA Purification Kit、0.25% 胰蛋白酶(1:200)　北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司；SuperStar miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit　北京康为世纪生物科技股份有限公司；Hieff UNICON® Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix　上海翌圣生物科技股份有限公司；二甲基亚砜　美国 Sigma-Aldrich 公司；*egfr* 多克隆抗体　沈阳万类生物技术有限公司；SABC 法免疫组化染色试剂盒　武汉博士德生物工程有限公司；引物序列由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成(表 1)。

表 1　qRT-PCR 引物序列
Table 1　Sequences of primers for qRT-PCR

基因名称	引物序列(5'-3')
miR-1-3p	F: GCGCTGGAATGTAAAGAAGTATG
miR-1-5p	F: ACAUACUUCUUUAUAUGCCCAU
miR-145-5p	F: CAGTCTTGTCCAGTTTTCCCAG
miR-125b-1-3p	F: ACGGGTTAGGCTCTTGGGAGCT
miR-125b-2-3p	F: ACAAGTCAGGCTCTTGGGAC
miR-125b-5p	F: TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA
miR-133b	F: CTCAGCTTTGGTCCCCTTCAAC
miR-125a-3p	F: GCGCACAGGTGAGGTTCTTG
miR-125a-5p	F: GCGCTCCCTGAGACCCTT
miR-133a-3p	F: GCCTTTGGTCCCCTTCAAC
miR-133a-5p	F: GGCGAGCTGGTAAAATGGAACCAAAT
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACA
U6	R: AACGCTTCACGAATTTGCGT
egfr	F: AGGCACGAGTAACAAGCTCAC
egfr	R: ATGAGGACATAACCAGCCACC
β-actin	F: TCCAGCCTTCCTTCTTGGGT
β-actin	R: GCACTGTGTTGGCATAGAGGT

JTY-2 电热恒温鼓风培养箱　上海龙联科仪器有限责任公司；JF-200 高速粉碎机　奥特莱斯(北京)商业管理有限公司；SCIENTZ-10nd 超低温冷冻干燥机　宁波新芝生物科技股份有限公司；JC-6000 超净工作台　上海博迅医疗生物仪器股份有限公司；HH.CP-7 CO_2 细胞恒温培养箱　德国 Heraeus 公司；5424-R 高速冷冻离心机　德国 Eppendorf 公司；QuantShudio™ 3 实时荧光定量 PCR 仪　美国 Applied Biosystems 公司；N50 Touch 超微量紫外分光光度计　德国 Implen 公司；Infinite F50 酶标仪　瑞士 Tecan 公司；ICX41 倒置生物/荧光显微镜　宁波舜宇光学科技(集团)有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　蛹虫草水提物制备　蛹虫草子实体(XG)60 ℃烘干至恒重，机械粉碎后过 80 目筛网，获得蛹虫草干粉，85 ℃ 水浴浸提 3.5 h，4000 r/min 离心 10 min，上清液真空冷冻干燥过夜，获得冻干粉[17]。以 F-12K 完全培养基制备 4 mg/mL 蛹虫草工作液，0.22 μm 过滤除菌，4 ℃ 密封保存。

1.2.2　转录组测序分析　实验组(XG 组)为 A549 细胞 5×10^5 个以 4 mg/mL 蛹虫草工作液处理 24 h，对照组(CK 组)以完全培养基处理，收集细胞后委托广州基迪奥生物科技有限公司构建文库并开展转录组测序分析[18]。以 $P<0.05$ 且 $|\log_2FC|>1$ 为标准，筛选差异表达基因(Differentially Expressed Genes，DEGs)，通过 KEGG 数据库(https://www.kegg.jp/)进行通路富集分析，根据“MicroRNAs in cancer”信号通路(ko05206)的 Lung cancer 模块，获得与“survival”相关 DEGs 存在靶向关系的候选 miRNAs。利用 Kaplan-Meier plotter 数据库(https://kmplot.com/)[19]，对候选 miRNAs 的表达水平与患者生存率间进行关联分析。

1.2.3　qRT-PCR 检测 EGFR mRNA 表达量　根据各试剂盒指导要求，提取 XG 组和 CK 组细胞的 mRNA，逆转录合成 cDNA，逆转录反应体系(20 μL)：2× miRNA RT Mix 10 μL，miRNA Enzyme Mix 1.5 μL，总 RNA 4 μg，补充 RNase-free 水至 20 μL。反应程序：37 ℃ 60 min；85 ℃ 5 min。cDNA 产物于−20 ℃ 保存。qPCR 反应体系(20 μL)：SYBR Green Master Mix 10 μL，正反向引物各 0.4 μmol/L，cDNA 模板 2 μL，补充 RNase-free 水至 20 μL。反应程序：95 ℃ 预变性 10 min；95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min，40 个循环。以 *β*-actin 为内参基因，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 计算 *egfr* 的相对表达量。

1.2.4　qRT-PCR 检测 miRNA 表达量　根据各试剂盒指导要求，提取 XG 组和 CK 组细胞的 miRNAs，合成 miRNA 第一链 cDNA，反应体系(20 μL)：2× miRNA RT Mix 10 μL，miRNA Enzyme Mix 1.5 μL，总 RNA 4 μg，补充 RNase-free 水至 20 μL。反应程序：37 ℃ 60 min；85 ℃ 5 min。cDNA 产物于−20 ℃ 保存。qPCR 反应体系及反应程序同 1.2.3，以 U6 snRNA 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各 miRNAs 的相对表达量。

1.2.5　miRNA 功能获得实验

1.2.5.1　瞬时转染 miRNA mimics　A549 细胞以 5×10^5 个/mL 密度、BEAS-2B 细胞以 4×10^4 个/mL 密度接种于 6 孔板，2 mL/孔，设置空白组、NC 组(阴性对照组，转染阴性对照序列)和 mimics 组(转染 miRNA mimics)，常规培养 12 h 后进行转染。参照转染试剂盒说明书进行以下操作，试剂 A：KEL™ RNA Transfection Reagent 7.5 μL 与 200 μL Opti-MEM 室温孵育 5 min；试剂 B：阴性对照序列或 miRNA mimics(终浓度 50 nmol/L)与 200 μL Opti-MEM 混合。NC 组和 mimics 组分别加入 A 与 B 混合液 400 μL/孔，空白组加入等体积完全培养基，培养 6 h 后各组更换完全培养基，继续培养 24 h。

qRT-PCR 检测各组 miRNAs 表达量，方法同 1.2.4。

1.2.5.2 MTT 法检测 细胞转染后常规培养 24 h，加入 5 mg/mL MTT 溶液，20 μL/孔，37 ℃ 孵育 4 h。弃上清后每孔加入 150 μL DMSO，室温振荡，酶标仪检测各孔的 $OD_{492\ nm}$ 值。抑制率计算：抑制率(%)=($OD_{对照孔}$−$OD_{实验孔}$)/($OD_{对照孔}$−$OD_{空白孔}$)×100。

1.2.5.3 Annexin V-FITC/PI 染色 细胞转染后常规培养 24 h，预冷 PBS 洗涤 1 次，依次加入 500 μL 1× Binding Buffer、5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 染液，室温避光孵育 10 min。4% 多聚甲醛固定 10 min，倒置荧光显微镜下观察，并采集图像，ImageJ 软件计算各组随机 10 个视野荧光强度。

1.2.6 miRNA 功能缺失实验

1.2.6.1 瞬时转染 miRNA inhibitor 及检测 设置 NC 组(阴性对照组，转染阴性对照序列)、Inhibitor 组(转染 miRNA inhibitor)、Inhibitor+XG 组(转染 miRNA inhibitor+4 mg/mL 蛹虫草处理)，参照转染试剂盒说明书进行转染。转染 6 h 后，NC 组和 Inhibitor 组更换为完全培养基，Inhibitor+XG 组更换为 4 mg/mL 蛹虫草工作液，继续培养 24 h。qRT-PCR 法检测各组 3 个 miRNAs 的表达量，方法同 1.2.4，MTT 法检测细胞抑制率，方法同 1.2.5.2。

1.2.6.2 免疫细胞化学染色 设置 NC 组(阴性对照组，转染阴性对照序列)、NC+XG 组(4 mg/mL 蛹虫草处理)、inhibitor 组(转染 miRNA inhibitor)、inhibitor+XG 组(转染 miRNA Inhibitor+4 mg/mL 蛹虫草处理)，细胞处理后常规培养 24 h，经冷丙酮固定 10 min，根据试剂盒要求进行 SABC 免疫组织化学染色，其中每个样本滴加 EGFR 抗体工作液(1∶100 稀释)50 μL，37 ℃ 孵育 2 h，DAB 显色 2 min 后，普通光学显微镜下观察，并采集图像，采用 ImageJ 软件计算随机 10 个视野灰度值。

1.3 数据处理

所有实验均进行三次独立生物学重复，每个实验设置至少三次技术重复。实验数据以 mean±SD 表示。数据统计分析采用 SPSS 23.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和组间比较分析(Tukey's HSD 检验)，显著性检验水平 α=0.05(*P<0.05，**P<0.01)。通过 GraphPad Prism 8 和基迪奥生物信息云平台(https://www.omicshare.com/)完成绘图及生物信息学分析。

2 结果与分析

2.1 蛹虫草调控 A549 细胞生长活性目标 miRNA 的筛选

2.1.1 生信分析预测蛹虫草参与调控的候选 miRNA

基于 CK 组基因表达量，XG 组共筛选到 7211 个 DEGs，并在“MicroRNAs in cancer”信号通路(ko05206)显著富集，列第 3 位(图 1A)，与肺癌

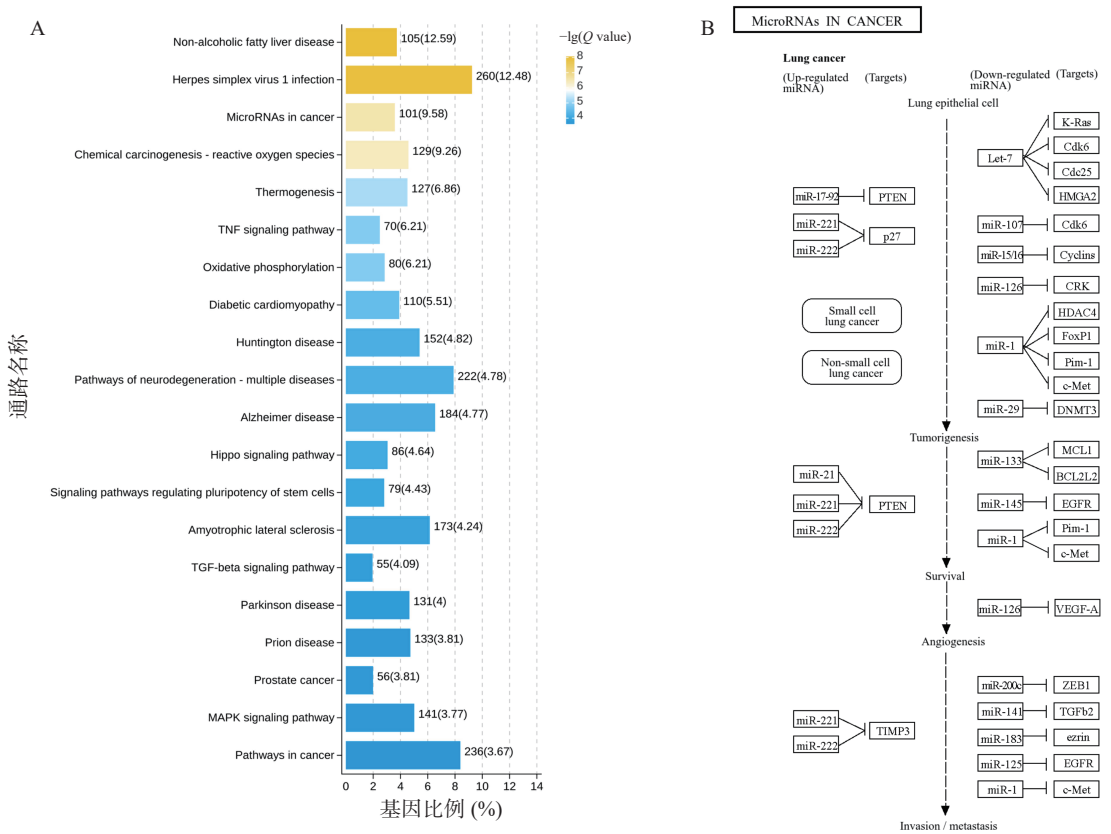


图 1 DEGs 的 KEGG 富集情况

Fig.1 KEGG enrichment analysis of DEGs

注：A：Top 20 信号通路；B：microRNAs in cancer 通路中 Lung cancer 调控模块。

表 2　基于 DEGs 筛选到的候选 miRNAs

Table 2　Candidate miRNAs screened based on DEGs

DEGs	miRNA	miRNA序列
pim1、*met*	*miR-1-3p*	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU
met	*miR-1-5p*	ACAUACUUCUUUAUAUGCCCAU
egfr	*miR-125a-3p*	ACAGGUGAGGUUCUUGGGAGCC
egfr	*miR-125a-5p*	UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA
egfr	*miR-125b-1-3p*	ACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCU
egfr	*miR-125b-2-3p*	UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC
egfr	*miR-125b-5p*	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA
mcl1、*bcl2l2*	*miR-133a-3p*	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG
mcl1、*bcl2l2*	*miR-133a-5p*	AGCUGGUAAAAUGGAACCAAAU
mcl1、*bcl2l2*	miR-133b	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUA
egfr	*miR-145-5p*	GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCU

注：下划线序列为种子序列。

“survival”相关的 DEGs 共 5 个，查询到 11 个与上述 DEGs 存在调控关系的候选 miRNAs（表 2），其中 *miR-125a-3p*、*miR-125a-5p*、*miR-125b-1-3p*、*miR-125b-2-3p*、*miR-125b-5p*、*miR-145-5p* 皆与 *egfr* 存在调控关系。Kaplan-Meier 生存分析中，上述 6 个 miRNAs 的生存曲线风险比（hazard ratio，HR）均<1，其中，*miR-1*、*miR-125a*、*miR-125b*、*miR-133a*、*miR-145* 的 P<0.05。提示在相同的时间段内，这些 miRNAs 的低表达与肺腺癌患者的不良预后显著相关（图 2）。

2.1.2　蛹虫草对 A549 细胞 miRNA 表达水平的影响　11 个候选 miRNAs 中，仅 *miR-125b-1-3p*、*miR-125b-5p* 和 *miR-145-5p* 在蛹虫草处理后表达水平

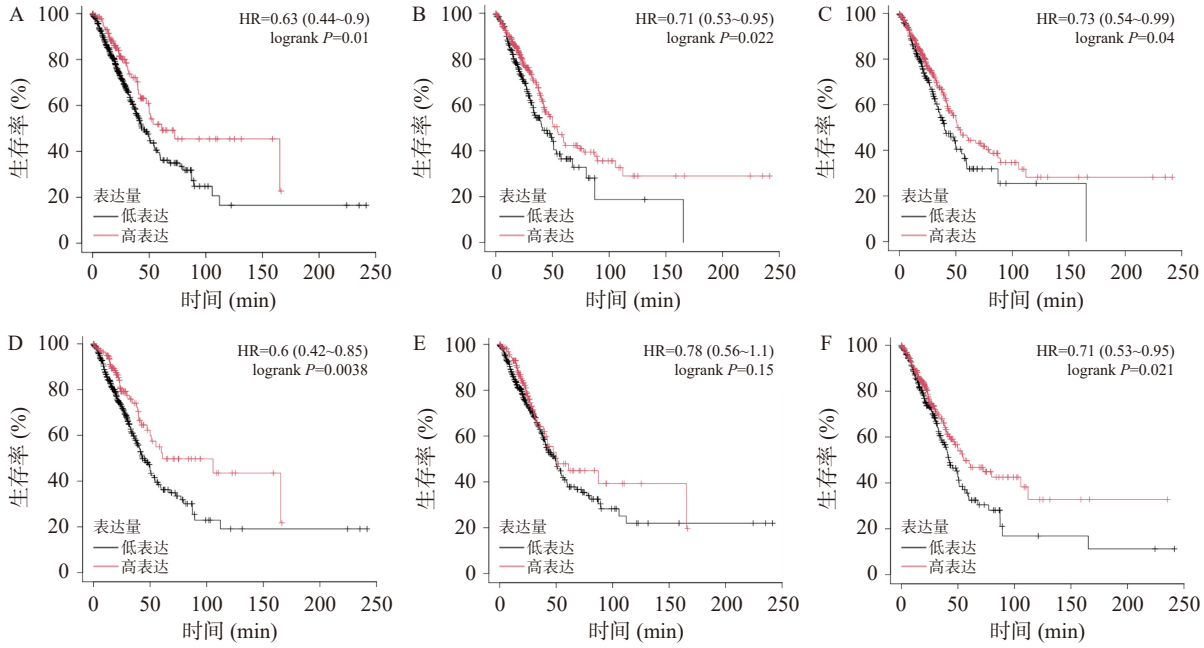
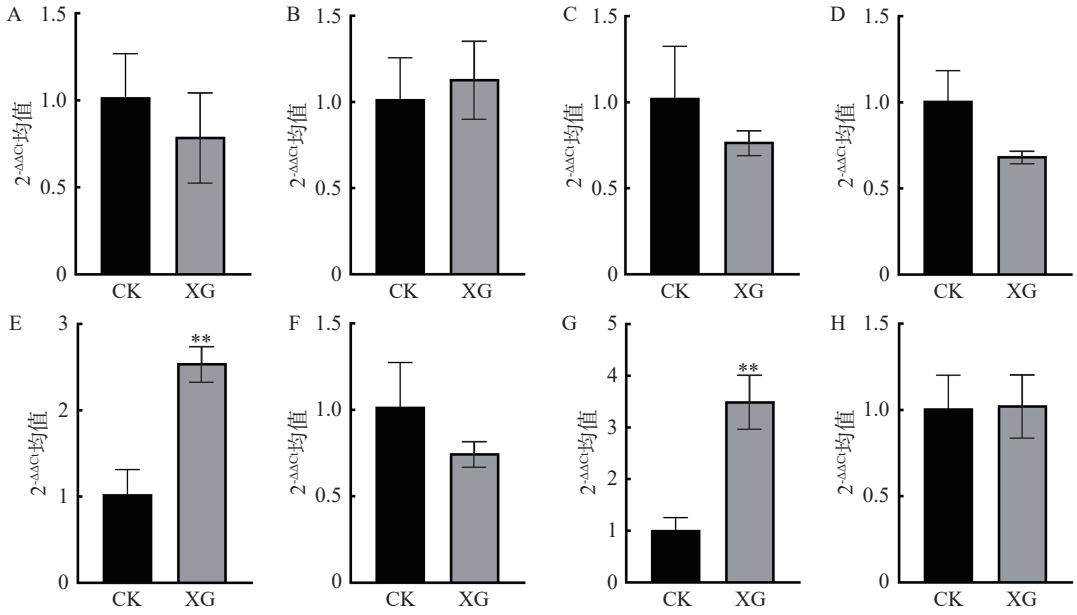


图 2　miRNA 的表达水平对肺腺癌患者生存率的影响

Fig.2　Effects of miRNA expression level on survival in patients with lung adenocarcinoma

注：A: *has-miR-1*; B: *has-miR-125a*; C: *has-miR-125b*; D: *has-miR-133a*; E: *has-miR-133b*; F: *has-miR-145*。



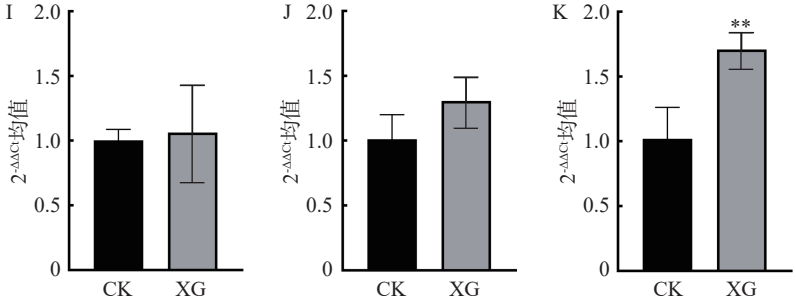


图 3　蛹虫草对 11 个候选 miRNAs 表达量的影响

Fig.3　Effects of *Cordyceps militaris* on the expression levels of 11 candidate miRNAs

注: A: *miR-1-3p*; B: *miR-1-5p*; C: *miR-125a-3p*; D: *miR-125a-5p*; E: *miR-125b-1-3p*; F: *miR-125b-2-3p*; G: *miR-125b-5p*; H: *miR-133a-3p*; I: *miR-133a-5p*; J: *miR-133b*; K: *miR-145-5p*; **表示与 CK 组相比差异极显著, $P<0.01$。

显著上调($P<0.01$), *miR-125b-5p* 的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 均值达 3.509±0.503, *miR-125b-1-3p* 为 2.548±0.19, *miR-145-5p* 为 1.709±0.131(图 3), 说明蛹虫草处理可以影响人肺癌细胞 A549 上述 3 个 miRNAs 的表达。序列匹配分析进一步确认, *miR-145-5p*、*miR-125b-1-3p*、*miR-125b-5p* 的种子序列与 *egfr* 的 3'UTR 区皆存在特异性结合位点(图 4), 因此被筛选为后续研究的目标 miRNA。

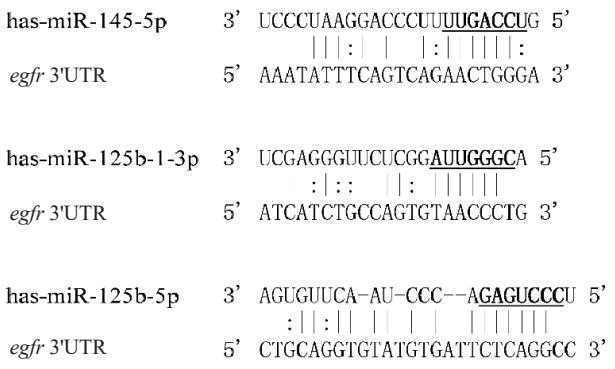


图 4　*egfr* 与 3 个目标 miRNAs 种子序列的靶向结合示意图

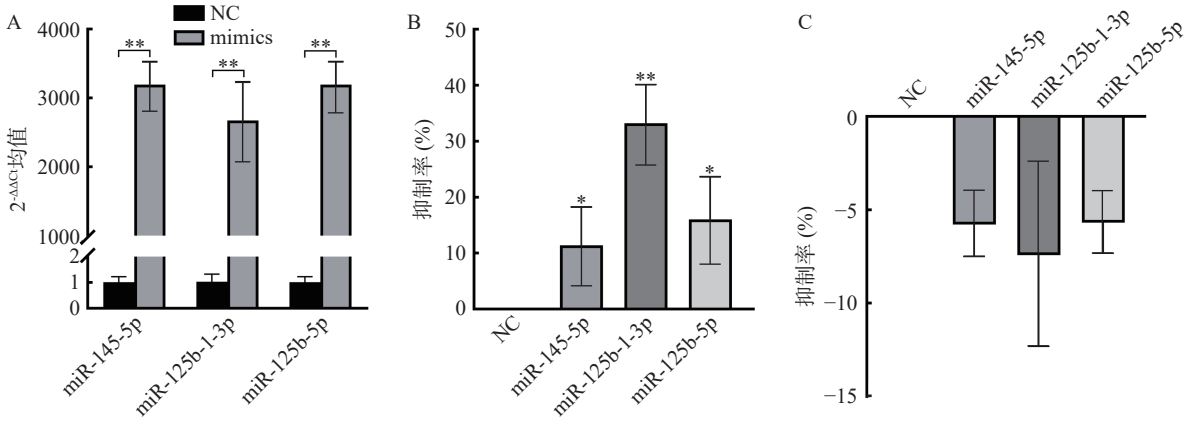
Fig.4　Schematic representation of the targeted binding between *egfr* and the seed sequences of three target miRNAs

2.1.3　目标 miRNA 对 A549 细胞增殖活性的影响

如图 5A 所示, 转染特异性 miRNA mimics 后, A549 细胞 *miR-145-5p*、*miR-125b-1-3p* 和 *miR-125b-5p* 的表达量均显著升高($P<0.01$), 并均表现出显著的抑制细胞增殖作用($P<0.05$), 其中, *miR-125b-1-3p* 的抑制率最高, 达 32.19%($P<0.01$), *miR-145-5p* 的抑制率最低, 为 11.41%($P<0.05$)(图 5B), 但是对人肺上皮细胞 BEAS-2B 增殖活性均无明显影响(图 5C), 提示 3 个 miRNAs 的促增殖作用具有肿瘤特异性。Annexin V-FITC 染色可使早期凋亡细胞膜呈现绿色荧光, PI 染色可使中、晚期凋亡细胞呈现红色荧光, 如图 5D 和图 5E 显示, 各转染组绿色荧光信号强度均大于红色荧光, 说明 3 个 miRNAs 的过表达均主要诱导 A549 细胞发生早期凋亡。

2.2　蛹虫草通过目标 miRNA 介导 *egfr* 的转录后调控

2.2.1　蛹虫草-miRNA 调控轴对 A549 细胞增殖的影响　如图 6A 所示, 转染特异性 miRNA 的 inhibitor 后, *miR-145-5p* 和 *miR-125b-1-3p* 的表达水平无显著变化($P>0.05$), inhibitor 处理未显著抑制 miRNA 的表达量。同时 *miR-125b-5p* 下调显著($P<0.05$), 说明 miRNA inhibitor 与 *miR-125b-5p* 互补结合后, 不仅阻断成熟 miRNA 的功能, 也可能触发了 miRNA 的核酸酶降解等机制。如图 6B 所示, 与 NC 组相比, miRNA 功能抑制对 A549 细胞增殖活性呈现促进作用, 其中 *miR-145-5p* inhibitor 组的促增殖活性具有显著性($P<0.05$)。同时 3 种 miRNA inhibitor 转染均可显著削弱蛹虫草的抗肿瘤作用($P<0.05$), 表明 *miR-145-5p*、*miR-125b-1-3p* 和 *miR-125b-5p* 是蛹



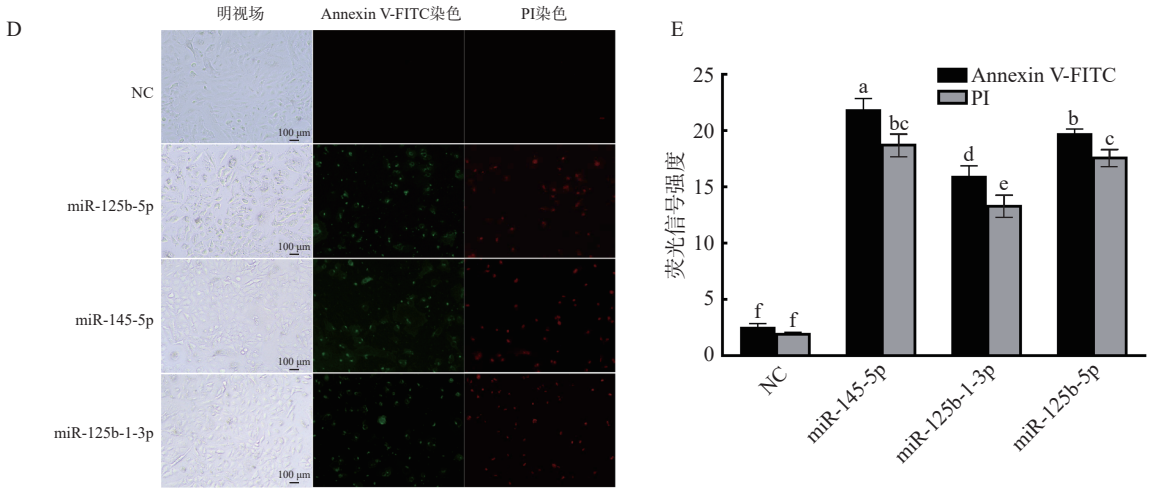


图 5　转染 miRNA mimics 对 A549 细胞增殖活性的影响

Fig.5　Effects of miRNA mimics transfection on proliferative activity of A549 cells

注: A: 对 miRNA 表达量的影响; B: 对 A549 细胞增殖的影响; C: 对 BEAS-2B 细胞增殖的影响; D: Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡双染图(10×20, 比例尺=100 μm); E: Annexin V-FITC/PI 双染荧光信号强度; *表示与 NC 组相比差异显著, P<0.05; **表示与 NC 组相比差异极显著, P<0.01; 小写字母不同表示组间在 P<0.05 水平上存在显著差异。

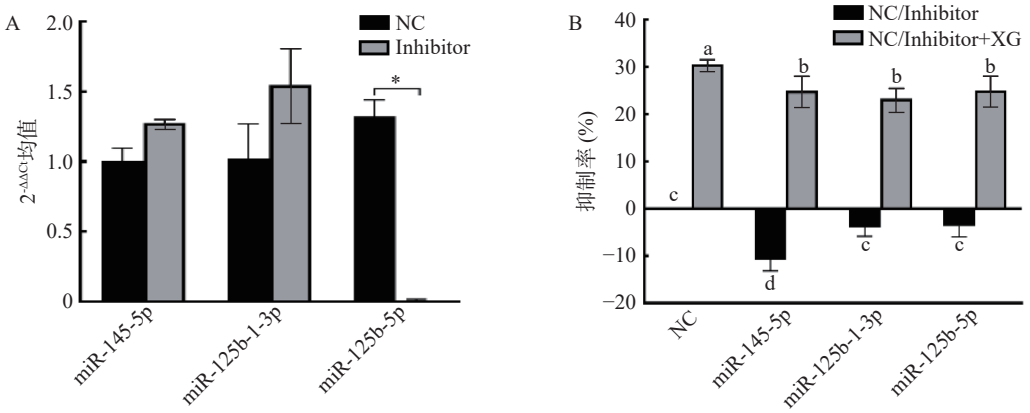


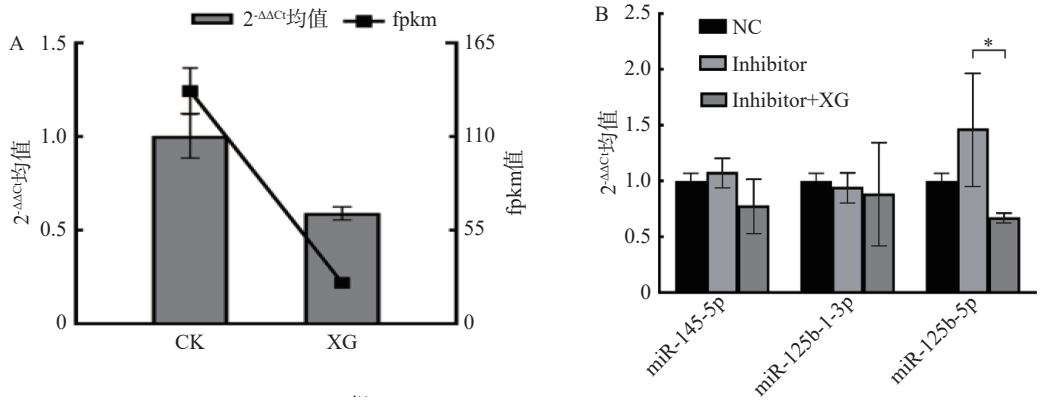
图 6　miRNA 功能缺失对蛹虫草抗肿瘤活性的影响

Fig.6　Effects of transfection with miRNA inhibitor and *Cordyceps militaris* on human lung cancer cells A549

A: miRNA 的表达水平; B: 对增殖活性的影响; 注: *表示与 NC 组相比差异显著, P<0.05; 小写字母不同表示组间在 P<0.05 水平上存在显著差异。

虫草发挥抗肿瘤活性的关键环节。

2.2.2　蛹虫草-miRNA 调控轴对 A549 细胞 *egfr* 表达的影响　转录组测序及 qRT-PCR 检测结果显示, 蛹虫草处理可显著下调 A549 细胞 *egfr* mRNA 的表达量(P<0.01)(图 7A)。同时, 相对于 NC 组, miRNA inhibitor 处理后, 蛹虫草未能诱导 *egfr* mRNA 表达量发生显著变化(P>0.05)(图 7B)。同时各 miRNA inhibitor 处理组 EGFR 蛋白质表达水平上调明显(P<0.05), inhibitor+XG 联合处理可显著抑制 EGFR 蛋白的表达量(P<0.05), 且高于 NC+XG 组(P<0.05)



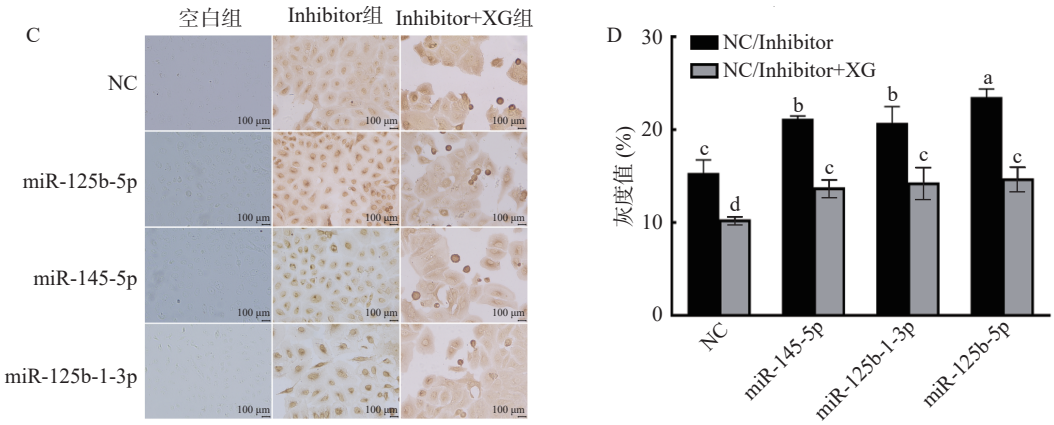


图 7 蛹虫草对 A549 细胞 *egfr* 表达情况的影响

Fig.7 Effects of *egfr* expression in A549 cells regulated by *Cordyceps militaris*

注: A: 蛹虫草对 *egfr* mRNA 表达量的影响; B: miRNA 功能缺失对 *egfr* mRNA 表达量的影响; C: EGFR 蛋白的免疫细胞化学染色; D: EGFR 蛋白免疫组化染色阳性灰度值; *表示两组差异显著, $P<0.05$; 小写字母不同表示组间在 $P<0.05$ 水平上存在显著差异。

(图 7C~图 7D)。提示蛹虫草不仅可以抑制 *egfr* mRNA 的表达, 同时可以通过 *miR-145-5p*、*miR-125b-1-3p* 和 *miR-125b-5p* 实现对 *egfr* 的转录后调控, 进而降低 EGFR 蛋白的表达量发挥抗肿瘤活性。

3 讨论与结论

miRNA 在肿瘤细胞的发生发展中扮演着复杂的角色, 可以通过调控代谢相关基因, 改变肿瘤细胞的代谢途径、调控肿瘤微环境, 影响其生长和存活。本实验通过分析转录组原始数据发现, 蛹虫草诱导肺癌细胞 A549 产生的 DEGs 在“MicroRNAs in cancer”信号通路显著富集, 55% 候选 miRNAs 的调控靶基因为 *egfr*。其中有 3 个 miRNAs(*miR-125b-1-3p*、*miR-125b-5p* 和 *miR-145-5p*)的表达量在蛹虫草处理后显著上调($P<0.01$)。在生物医学研究中, TCGA、GEO 和 EGA 是三大常用的公共数据库, 分别存储不同类型的组学数据、基因表达数据和受控访问等关键数据, 特别是 TCGA 数据库储存有 2.5 PB 的数据, 对超过 1.1 万多名患者的肿瘤组织及配对正常组织进行了描述, 目前已被广泛应用于患者生存期、病理分型、治疗响应等研究领域。通过数据库查询及比对分析发现, 上述 3 个 miRNAs 高表达肺腺癌患者的预后情况要优于低表达患者。因此, 推测在蛹虫草的抗肿瘤机制中, 3 个 miRNAs 对 A549 细胞的 *egfr* 可能存在一定的调控关系, 作为本研究的目标 miRNAs 进行后续深入研究。

为了进一步确认上述 3 个 miRNAs 在肺癌细胞 A549 生长中扮演的角色, 功能获得实验结果显示, 过表达 *miR-125b-1-3p*、*miR-125b-5p* 和 *miR-145-5p* 均显著抑制肺癌细胞 A549 的增殖并发生凋亡($P<0.05$), 且 *egfr* 的 3'UTR 区域与 3 个 miRNAs 的种子序列均存在特异性结合位点。种子序列是 miRNA 功能的核心区域, 是 miRNA 识别靶标的核心, 依赖种子序列可以预测 miRNA 的靶基因。同时, 虽然中子序列短小, 但其高度特异性使得单个 miRNA 可调控数百个基因, 构成复杂的基因调控网络。Zhang 等[6] 研究发现过表达 *miR-125b-1-3p* 可抑制 NSCLC 细胞增殖, 通过靶向调控 S1PR1 在 NSCLC 细胞中发挥抗肿瘤功能。*miR-125b-5p* 在肝癌细胞中表达降低, 且过表达 *miR-125b-5p* 可抑制 HepG2 和 Huh-7 细胞的增殖、迁移和侵袭, 诱导凋亡[20]。研究表明 *miR-145-5p* 在肺腺癌的临床标本中表达量下调, 且可阻断肺腺癌细胞的恶性能力, 如增殖、迁移、侵袭等行为[21]。因此, *miR-125b-1-3p*、*miR-125b-5p* 和 *miR-145-5p* 可能通过调控特定的信号通路或靶基因参与抑制肺癌生长过程, 可能成为治疗非小细胞肺癌的潜在靶点。

蛹虫草富含虫草素等多种生物活性成分, 具有显著的抗炎、抗衰老、抑制肿瘤生长及免疫调节等作用, 在肿瘤辅助治疗领域展现出广阔的应用前景[22−24]。MTT 检测结果显示, 转染 *miR-125b-1-3p*、*miR-125b-5p* 和 *miR-145-5p* inhibitor 后, A549 细胞的增殖活性均增强, *miR-125b-1-3p*、*miR-125b-5p* 和 *miR-145-5p* 功能的缺失能够削弱蛹虫草对 A549 细胞增殖的抑制作用。虫草素与顺铂均能上调 *miR-126*、*miR-145*、*miR-205*、*miR-429* 和 *miR-499a* 的表达, 且两者联用表现出协同抗肿瘤效应[25]。Zhang 等[26] 研究发现虫草素通过 *miR-33b* 减弱了黑色素瘤的迁移和侵袭性。进一步证实蛹虫草需要上述 miRNAs 的参与才能发挥更好的抗肿瘤活性。

EGFR 基因是一种膜结合型酪氨酸激酶受体, *egfr* 激活后, 通过 RAS/RAF/MAPK、PI3K/AKT/mTOR 等通路, 促进细胞周期的进展, 通过激活 SNAIL、SLUG 等转录因子, 诱导上皮-间质转化, 促进肿瘤细胞侵袭和转移。同时, *egfr* 是多种恶性肿瘤中高度表达的驱动因子[27−28], 参与多种恶性肿瘤的细胞增殖、存活、迁移、侵袭和血管生成等生物学过程, 是重要的肿瘤治疗靶点[29]。Hsu 等[30] 研究发现虫草素可抑制 *egfr* 的信号传导, 且显著降低口腔癌组织中 *egfr* 的表达量($P<0.05$)。本研究结果显示, 蛹虫

草处理可显著下调 A549 细胞中 *egfr* 表达量。转染 miRNA inhibitor 后，各 Inhibitor+XG 组的 EGFR 蛋白表达量均显著低于单独 Inhibitor 组（$P<0.05$）。以上结果表明，蛹虫草可以通过转录和转录后调控两个水平影响靶基因 *egfr* 的表达，进而发挥抗肿瘤活性。

综上，本研究基于生物信息学预测分析，通过整合实验验证与转录后调控机制，成功鉴定出蛹虫草-*egfr* 调控轴上一组具有显著调控活性的 miRNAs，从转录后调控的角度进一步丰富了蛹虫草的抗肿瘤机制。研究结果不仅从表观遗传调控角度为蛹虫草的药用价值提供了新的科学依据，也为 miRNA 在肿瘤治疗中的应用提供了潜在的靶点。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] GIACCONE G, HE Y F. Current knowledge of small cell lung cancer transformation from non-small cell lung cancer[J]. Seminars in Cancer Biology, 2023, 94: 1−10.

[2] 孙菲, 王刚, 张金仿. miRNA、CEA 及 Monototal 在非小细胞肺癌诊断中的价值[J]. 医学综述, 2020, 26(7): 1429−1433. [SUN Fei, WANG Gang, ZHANG Jinfang. Value of miRNA, carcinoembryonic antigen and monototal in diagnosis of non-small cell lung cancer[J]. Medical Recapitulate, 2020, 26(7): 1429−1433.]

[3] AUDIC Y, HARTLEY R S. Post-transcriptional regulation in cancer[J]. Biology of the Cell, 2004, 96(7): 479−498.

[4] 冯涛, 肖向茜, 盛望. miRNA 在肺癌及肺癌耐药中的作用机制及治疗的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(1): 61−65. [FENG Tao, XIAO Xiangqian, SHENG Wang. Research progress on lung cancer therapy and the mechanism of microRNA in lung cancer and its drug resistance[J]. Medical Recapitulate, 2018, 24(1): 61−65.]

[5] HUSSEN B M, HIDAYAT H J, SALIHI A, et al. microRNA: A signature for cancer progression[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 138: 111528.

[6] ZHANG Xiang, LIU Yu, HUANG Weicong, et al. miR-125b-1-3p exerts antitumor functions in lung carcinoma cells by targeting S1PR1[J]. Chinese Medical Journal, 2018, 131(16): 1909−1916.

[7] WU Chunyan, HOU Likun. P2.03b-079 decreased expression of miR-125a-3p is associated with the clinical outcome of non-small cell lung cancer patients topic: Biomarkers[J]. Journal of Thoracic Oncology, 2017, 12(1): S983−S984.

[8] HOU Likun, LUO Pei, MA Yushui, et al. microRNA-125a-3p downregulation correlates with tumorigenesis and poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer[J]. Oncology Letters, 2017, 14(4): 4441−4448.

[9] XU Yanhui, ZHANG Lei, XIA Lilong, et al. microRNA-133a-3p suppresses malignant behavior of non-small cell lung cancer cells by negatively regulating ERBB2[J]. Oncology Letters, 2021, 21(6): 457.

[10] PASSARO A, JÄNNE P A, MOK T, et al. Overcoming therapy resistance in EGFR-mutant lung cancer[J]. Nature Cancer, 2021, 2(4): 377−391.

[11] LIM S M, JEONG Y, HONG S. Strategies to overcome acquired resistances conferred by mutations in the kinase domain of EGFR[J]. Future Medicinal Chemistry, 2016, 8(8): 853−878.

[12] ROSKOSKI R. Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers[J]. Pharmacological Research, 2019, 139: 395−411.

[13] LEONETTI A, SHARMA S, MINARI R, et al. Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer[J]. British Journal of Cancer, 2019, 121(9): 725−737.

[14] 张鑫喆. 不同虫草抗肿瘤活性的细胞学比较研究[D]. 沈阳: 沈阳师范大学, 2019. [ZHANG X Z. Cytological comparison of antitumor activity of different *Cordyceps* species[D]. Shenyang: Shenyang Normal University, 2019.]

[15] WANG Zheng, WU Xue, LIANG Yanni, et al. Cordycepin induces apoptosis and inhibits proliferation of human lung cancer cell line H1975 *via* inhibiting the phosphorylation of EGFR[J]. Molecules, 2016, 21(10): 1267.

[16] WEI Chunli, YAO Xiaojun, JIANG Zebo, et al. Cordycepin inhibits drug-resistance non-small cell lung cancer progression by activating AMPK signaling pathway[J]. Pharmacological Research, 2019, 144: 79−89.

[17] 崔明琦, 于凯雯, 宋扬, 等. 蛹虫草水提物影响人胃癌细胞 BGC-823 不同 RCD 通路的转录组分析[J]. 食品工业科技, 2025, 46(4): 10−18. [CUI Mingqi, YU Kaiwen, SONG Yang, et al. Transcriptome analysis of effect of *Cordyceps militaris* aqueous extract in human gastric cancer cell BGC-823 on different RCD pathways[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(4): 10−18.]

[18] The cDNA/DNA/Small RNA libraries were sequenced on the Illumina sequencing platform by Genedenovo Biotechnology Co. Ltd (Guangzhou, China).

[19] GYŐRFFY B. Discovery and ranking of the most robust prognostic biomarkers in serous ovarian cancer[J]. GeroScience, 2023, 45(3): 1889−1898.

[20] YANG Ling, JIANG Mina, LIU Yang, et al. Crosstalk between lncRNA DANCR and miR-125b-5p in HCC cell progression [J]. Tumori, 2021, 107(6): 504−513.

[21] MISONO S, SEKI N, MIZUNO K, et al. Dual strands of the miR-145 duplex (miR-145-5p and miR-145-3p) regulate oncogenes in lung adenocarcinoma pathogenesis[J]. Journal of Human Genetics, 2018, 63(10): 1015−1028.

[22] DENG Qifeng, LI Xinrui, FANG Chunqiang, et al. Cordycepin enhances anti-tumor immunity in colon cancer by inhibiting phagocytosis immune checkpoint CD47 expression[J]. International Immunopharmacology, 2022, 107: 108695.

[23] 李佩瑶, 高睿晗, 兰春阳, 等. 蛹虫草多糖免疫调节机制的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(6): 1342−1345. [LI Peiyao, GAO Ruihan, LAN Chunyang, et al. Research progress on immune regulation mechanism of *Cordyceps militaris* polysaccharide[J]. Chinese Journal of Immunology, 2023, 39(6): 1342−1345.]

[24] 王泽, 崔明辉, 廖思晴, 等. 四类虫草诱导人胃癌细胞 BGC-823 衰老的转录组预测分析[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 2024, 42(6): 537−543. [WANG Ze, CUI Minghui, LIAO Siqing, et al. Transcriptome prediction analysis of four *Cordyceps* species inducing senescence in human gastric cancer BGC-823

cells[J]. Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition), 2024, 42(6): 537−543.]

[25] 刘昌杰. 虫草素对体外培养肺癌细胞株 A549 恶性生物学行为的调节及其与相关 miRNA 表达的关系[J]. 海南医学院学报, 2015, 21(12): 1597−1600. [LIU Changjie. Regulatory effects of cordycepinon on malignant behavior of lung cancer cell line cultured *in vivo* and its relationship with related miRNA expression[J]. Journal of Hainan Medical University, 2015, 21(12): 1597−1600.]

[26] ZHANG Pu, HUANG Changjin, FU Changliang, et al. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) suppressed HMGA2, Twist1 and ZEB1-dependent melanoma invasion and metastasis by targeting miR-33b[J]. Oncotarget, 2015, 6(12): 9834−9853.

[27] CUELLAR-VITE L, DONAUBAUER E M, WEBER-BONK K L, et al. Exploiting YES1-driven EGFR expression improves the efficacy of EGFR inhibitors[J]. Molecular Cancer Research, 2025, 23(5): 391−404.

[28] LIN E P, HUANG B T, LAI W Y, et al. PINK1-mediated inhibition of EGFR dimerization and activation impedes EGFR-driven lung tumorigenesis[J]. Cancer Research, 2021, 81(7): 1745−1757.

[29] SUNG W J, KIM D, ZHU A L, et al. The lysosome as a novel therapeutic target of EGFR-mediated tumor inflammation[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 1050758.

[30] HSU P Y, LIN Y H, YEH E L, et al. Cordycepin and a preparation from *Cordyceps militaris* inhibit malignant transformation and proliferation by decreasing EGFR and IL-17RA signaling in a murine oral cancer model[J]. Oncotarget, 2017, 8(55): 93712−93728.